第4卷第4期
1983年11月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 4, No. 4
Nov., 1983

浙江蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 毒激肽释放酶 I 酶解产物激肽的鉴定

王心民*　戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所)

至今已知的蛇毒激肽释放酶作用于激肽原后都释放舒缓激肽，仅食鱼蝮(*Agkistrodon piscivorus piscivorus*)蛇毒激肽释放酶既释放舒缓激肽，又释放胰激肽(Iwanaga, 1979)。今对浙江蝮蛇毒激肽释放酶 I 作用于激肽原后的产物作了鉴定，证实也是舒缓激肽。因此蝮蛇毒激肽释放酶不同于哺乳动物的组织激肽释放酶，后者释放胰激肽(Fiedler, 1979)。

材 料 和 方 法

一、材料

激肽释放酶按前文（王心民，戚正武）分离提纯；激肽增强肽衍生物 Ile-Pro-Pro三肽由同实验室同志制备提供；牛血系上海大场牛羊肉经营部供给。合成舒缓激肽(BK)为上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品。

二、方法

1.激肽释放酶的生物活力，用离体豚鼠回肠收缩法测定，见前文（王心民，戚正武）。

2.双向层析、高压电泳

将样品点于新华 3 号滤纸（50×50厘米）左下方，距边缘约 8 厘米，反复点样和吹干，放入层析箱内平衡 2 小时，然后放入溶剂槽内，下行层析，约40小时。溶剂系统为正丁醇：醋酸：水＝4：1：5，取有机相。取出后晾干，转 90° 置于电泳支架上，喷电泳缓冲液（吡啶：醋酸：水＝100：4：896，pH6.5）约50毫升，放入高压电泳槽内，电泳仪为美国 Gilson 公司产品。在2000伏电压，100 毫安电流条件下电泳 1 小时45分。停后取出晾干。喷0.05%茚三酮丙酮溶液约20毫升，50°C烘箱保温 1 小时显色。

3.N末端测定

* 北京医学院生化教研组。
本文1983年 1 月17日收到。

取5—10nM样品，溶于约0.2毫升67%吡啶溶液中，加入400微克DABITC(4-N，N—二甲氨基偶氮苯—4′—硫氰酸酯)，再加2滴吡啶，通氮气封管，摇匀后置50°C水浴保温2小时，用氮气吹干后，用正庚烷/乙酸乙酯（3：1）抽提，2000rpm离心3分钟，弃上清液，反复5—6次直至上清液无黄色为止，氮气吹干；加入40%三氟醋酸约0.1毫升裂解，通氮气封管，50°C水浴保温50分钟，通氮气吹干；加25微升左右无水乙醇溶解，点样于聚酰胺薄膜(3×3厘米)上，作定位标记的二乙胺和乙醇胺也点于同一点上，双向层析。先走第1相（醋酸：水＝1：2），吹干至无醋酸味后，转90°再走第2相（甲苯:正丁烷:烷醋酸＝2：1：1），吹干后，置浓盐酸瓶口上显色。

结 果 和 讨 论

一、高分子量（HMW）与低分子量（LMW）激肽原的初步分离纯化

1.牛血浆的制备

取EDTA30克，葡萄糖100克溶于1立升水中，再加入含1.5克苯甲基磺酰氟(PMSF)的异丙醇溶液500毫升，加水至2立升，混匀，置于塑料桶内。将新鲜牛血30立升左右倒入桶内，混匀，4°C下离心2500rpm，上清液约8立升，置于塑料桶中。

2. DEAE—纤维素（DE—22）吸附

将2.5立升DE—22纤维素（预先用含0.1M NaCl的0.02M Tris—HCl，pH7.5缓冲液平衡），倒入血浆中，于冰库（7°C）中搅拌1小时使蛋白吸在纤维素上，静置1小时，吸出上清液，将纤维素装入层析柱内（8×65厘米，内壁涂有硅油）。先用3立升平衡液洗柱，然后用4立升含0.6M NaCl的0.02M Tris—HCl缓冲液洗脱，流速约500毫升/小时，收集于塑料桶中（桶内预先放入200毫升 0.5%PMSF)。收集液对水透析。

3. CM—纤维素（CM—32）吸附

取800毫升CM—32纤维素（预先用0.05M醋酸pH5.2缓冲液平衡）倒入上述收集液（配至与缓冲液相同的浓度与pH）中，于7°C下搅拌1小时，静置1小时，倾出上清液（内含有LMW—激肽原Komiya, M. et al., 1974 a, b, c)。将CM—32纤维素装入层析柱（5×40厘米），用0.1—0.8M NaCl梯度洗脱，总体积2000毫升，pH5.2，用塑料瓶收集，每瓶250毫升。第3—7瓶收集液经蛇毒激肽释放酶或胰蛋白酶作用后有激肽释放，此即HMW-激肽原部分。由于血浆中前激肽释放酶的活力未能完全抑制，在4—7瓶中自发激活严重，因而只取第3瓶收集液透析、冻干。

4. DEAE—纤维素（DE—22）柱层析

CM—32不吸附部分（倾出之上清液），透析后调pH7.5，在塑料桶中与1800毫升DE—22纤维素（用含0.1M NaCl的0.02M Tris—HCl，pH7.5缓冲液平衡，搅拌1小时，7°C)，静置1小时，吸出上清液，将DE—22纤维素装入层析柱(7.5×50厘米)。先用1立升平衡液洗柱，然后用含0.4M NaCl的0.02M Tris—HCl缓冲液洗脱，用塑料瓶收集，每瓶400毫升，经生物活力测定，激肽原部分在第4—6瓶，即为LMW—激肽原，没有自发激活现象，因为血浆激肽释放酶一般不作用于LMW—激肽原。合并此部分，透析，冻干，约得12克。

5．LMW—激肽原的进一步纯化

将上述粗制LMW—激肽原称取3克，溶于40毫升0.01*M*磷酸缓冲液，pH8.0，70°C水浴加热2分钟，冰水浴速冷；45，000rpm超速离心30分钟，弃沉淀。用0.5*N*HCl将上清液调至pH4.9，再次超速离心30分钟，弃沉淀，取上清液。此时上清液中90%的杂蛋白被除去，所剩的LMW—激肽原虽仍含杂质，但已可作为测定蛇毒激肽释放酶活力的底物及其酶解产物了。

二、蛇毒激肽释放酶Ⅰ对LMW—激肽原的酶解

取上述部分纯化的LMW—激肽原上清液20毫升，加$5\times10^{-1}M$ EDAT溶液2.2毫升，并调pH至8.0，于37°C水浴中预先保温40分钟，取10微升测生物活力，表明无游离激肽存在。加入蝮蛇毒激肽释放酶Ⅰ冻干粉5毫克，搅匀，保温1小时，每隔10—15分钟取10微升监测生物活力，结果表明活力不断增高，至1小时后反应平衡，每毫升样品约释放相当于20微克合成舒缓激肽（BK），20毫升总释放量约400微克，真空冷冻干燥。

三、酶解产物的分离纯化

1．80%甲醇抽提

将上述酶解后的LMW—激肽原冻干粉置于塑料离心管中，加入20毫升80%甲醇，搅拌抽提2小时。3500rpm离心30分钟，吸出上清液，在旋转蒸发器上浓缩至干。加水1.0毫升，取1微升样品测生物活力，约相当于0.2微克合成BK，总量约相当200微克合成BK。

2．双向高压电泳层析

上述抽提液浓缩后点样于新华3号滤纸（50×50厘米）上（方法见“材料与方法”节），进行双向层析电泳。结束后，晾干滤纸，喷0.05%茚三酮溶液，置于50°C烘箱内保温显色2小时，有极淡的斑点产生，圈下，并用标准的合成BK以同样方法做对照。层析电泳图谱如下。

四、活性产物的鉴定

1．双向层析电泳图谱

层析电泳后滤纸上的斑点分别剪下，剪成细条置于小试管中，加0.01*N*醋酸2毫升，浸泡过夜。测定浸泡液的生物活力，结果表明，在激肽释放酶Ⅰ酶解释放产物的图谱上，只有相应于标准合成BK的一点有激肽的生物活力，而其它点均无活力（图1）。二者在层析上的Rf值也极为相似，标准BK的Rf值为0.40（16厘米/40厘米），释放的有激肽活力的产物Rf值为0.41（18厘米/43厘米）。

2．活性产物N末端的鉴定

经Edman微量法（方法见“材料和方法”节）测定表明，释放的活性产物N末端为精氨酸（图2），与舒缓激肽的N末端相同。这就基本可以确定，激肽释放酶Ⅰ所释放的激肽是舒缓激肽，而不是胰激肽等其它激肽。

3．舒缓激肽增强肽（BPP）对释放产物的增强作用

前文曾报导浙江蝮蛇毒(BPP)十一肽的C末端三肽仍具有明显的舒缓激肽增强活性（Chi Cheng-wu et al.，1982），因而用此合成的三肽Ile-Pro-Pro测定对释放产物的生物活力增强效应。与合成BK相同，释放产物的活力也同样可以被此合成三肽增强，其

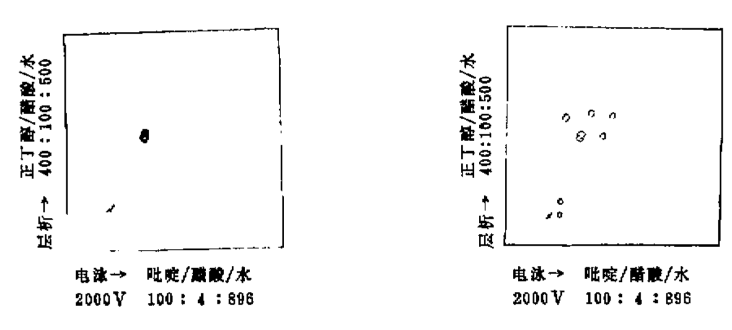


图 1 酶解释放产物的双向层析、电泳图谱

左：标准合成舒缓激肽(BK)。右：激肽释放酶Ⅰ的酶解释放产物。×原点 θ有生物活力的点

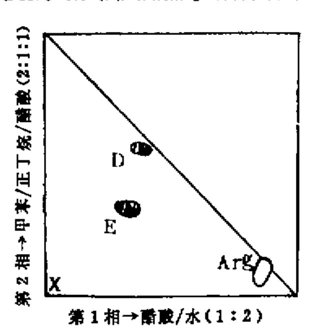


图 2 N末端氨基酸的聚酰胺薄膜中层析图谱

原点× 标记 D 二乙胺 E 乙二醇

增强幅度与相应量的合成BK相似(图3)。从而排除了释放产物是其它激肽的可能性，因BPP只对舒缓激肽具有增强效应。

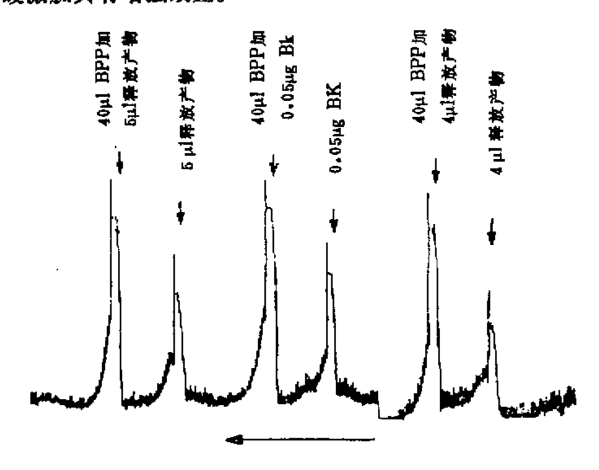


图 3 BPP(Ile-Pro-Pro)对释放产物活力的增强作用

结　论

1.从牛血浆中初步分离纯化高分子量激肽原及低分子量激肽原，前者由于在提取过程中有自发激活，得率较低，而后者得率较高。

2.浙江蝮蛇毒激肽释放酶Ⅰ作用于低分子量激肽原后，其酶解产物经分离提纯后，通过层析电泳、N末端及生物活力测定，证实为舒缓激肽。

参 考 文 献

Iwanaga, S. and Suzuki, T. 1979 Enzymes in snake venom. in *Snake Venom*. 118.Chen-Yuan Lee (ed.), Springer Press, Berlin.

Fiedler,F.1979 Enzymology of glandular kallikreins. *Handb. Exp. Pharm*.25 Suppl.103, Erdös, E. G. (ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

王心民，戚正武　浙江蝮蛇毒激肽释放酶Ⅰ的分离纯化及其性质的研究。(生物化学与生物物理学报，待发表)

Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma Kininogens. I. Further purification of high molecular weight kininogen and its physicochemical properties. *J. Biochem*. a 76, 811.

Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma kininogens.II. Micro-heterogeneities of high molecular weight kininogens and their structural relationships. *J. Biochem*. b 76, 823.

Komiya, M. et al. 1974 Bovine plasma kininogens. III. Structural comparison of high molecular weight and low molecular weight kininogens. *J. Biochem*. c 76, 833.

Chi Cheng-wu et al. 1982 Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Aghistrodon halys Pallas*). *Agents and Actions Supplements* 9, 282, Fritz, H. et al. (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.

CHARACTERIZATION OF THE KININ RELEASED BY KALLIKREIN I FROM SNAKE VENOM (*AGKISTRODON HALYS* PALLAS)

Wang Xinmin* and Qi Zhengwu

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The HMW-kininogen and LMW-kininogen from the bovine plasma were partially purified. Contrary to the LMW-kininogen, the yield of HMW-kininogen was rather low as a result of the spontaneous activation by plasma kallikrein during the separation.

The digestion product released from the LMW-kininogen by kallikrein I from the snake venom (*Agkistrodon halys* Pallas) was purified. This kinin was confirmed as bradykinin on the base of the behavior on the paper chromatography and high voltage electrophoresis, the N-terminal residue determination as well as the biological assay.

* Department of Biochemistry, Beijing Medical College.